

ORIGINAL

La activación de PPAR β/δ previene la hipertrigliceridemia causada por una dieta rica en grasas. Implicación de la AMPK y de la vía PGC-1 α -lipina 1-PPAR \star

Emma Barroso ^{a,b}, Alma M. Astudillo ^{b,c}, Jesús Balsinde ^{b,c} y Manuel Vázquez-Carrera ^{a,b,*}

^a Unidad de Farmacología, Departamento de Farmacología y Química Terapéutica e Institut de Biomedicina de la UB (IBUB), Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

^b CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, España

^c Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valladolid, España

Recibido el 20 de diciembre de 2012; aceptado el 10 de enero de 2013

Disponible en Internet el 22 de febrero de 2013

PALABRAS CLAVE

Dieta rica en grasa;
Dislipidemia;
Receptor activado
por proliferadores
peroxisómicos β/δ ;
Cinasa activada por
adenosinmonofosfato

Resumen

Introducción: El consumo excesivo de alimentos hipercalóricos y de alto contenido en grasas saturadas produce una dislipidemia aterogénica. En este estudio hemos analizado los efectos del activador de PPAR β/δ GW501516 sobre la hipertrigliceridemia inducida por una dieta rica en grasas.

Metodología: Ratones macho fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos: control (dieta estándar), dieta grasa (*high fat diet* [HFD], 35% grasa en peso, 58% kcal procedentes de grasa) y dieta grasa más GW501516 (3 mg/kg/día). La duración del tratamiento fue de 3 semanas.

Resultados: La HFD causó hipertrigliceridemia acompañada de una reducción de los niveles hepáticos de la proteína AMPK fosforilada y de los niveles de ARNm *Pgc-1 α* y *lipina 1*. Estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con GW501516. El mantenimiento de la AMPK fosforilada tras el tratamiento con GW501516 podría deberse al aumento de la relación AMP/ATP. GW501516 incrementó los niveles de proteína lipina 1 nuclear acompañado por una amplificación de la vía PGC-1 α -PPAR α y un aumento de la actividad de unión al ADN de PPAR α , así como el incremento en la expresión de los genes diana de PPAR α implicados en la β -oxidación de ácidos grasos. GW501516 también aumentó los niveles plasmáticos de β -hidroxibutirato, producto final de la β -oxidación hepática. Finalmente, GW501516 incrementó los niveles del ligando endógeno de PPAR α , 16:0/18:1-fosfatidilcolina, y aumentó la expresión del receptor de las VLDL en hígado.

Conclusión: El efecto hipotriglyceridemiante de GW501516 en ratones sometidos a HFD se acompaña de un aumento de los niveles de la AMPK fosforilada y de un aumento de la vía PGC-1 α -lipina 1-PPAR α .

© 2012 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

\star Una comunicación referente a esta línea de trabajo, titulada «La activación de PPAR β/δ previene la hipertrigliceridemia causada por una dieta rica en grasas. Implicación de la AMPK y de la vía PGC-1 α -lipina 1-PPAR α », fue presentada en el XXIV Congreso Nacional de la SEA (Sevilla 2011) y fue galardonada con una mención especial.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mvazquezcarrera@ub.edu (M. Vázquez-Carrera).

KEYWORDS

High fat diet;
Dyslipidemia;
Peroxisome
proliferator-activator
receptor beta/delta;
AMP-activated
protein kinase

**PPAR β/δ Activation prevents hypertriglyceridemia caused by a high fat diet.
Involvement of AMPK and PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway**

Abstract

Introduction: Excessive consume of hypercaloric and high in saturated fat food causes an atherogenic dyslipidemia. In this study we analyzed the effects of PPAR β/δ activator GW501516 on the hypertriglyceridemia induced by a high-fat diet.

Methods: Male mice were randomized in three groups: control (standard chow), high fat diet (HFD, 35% fat by weight, 58% Kcal from fat) and high fat diet plus GW501516 (3 mg/Kg/day). Treatment duration was three weeks.

Results: HFD-induced hypertriglyceridemia was accompanied by a reduction in hepatic levels of phospho-AMPK and in PGC-1 α and Lipin 1 mRNA levels. All these effects were reversed by GW501516 treatment. The lack of changes in phospho-AMPK levels after GW501516 treatment in HFD-fed animals could be the result of an increase in the AMP/ATP ratio. GW501516 treatment also increased Lipin 1 protein levels in the nucleus, led to the amplification of the PGC-1 α -PPAR α pathway and increased PPAR α DNA-binding activity, as well as the expression of PPAR α -target genes involved in fatty acid oxidation. GW501516 also increased β -hydroxybutyrate plasmatic levels, a hepatic β -oxidation end product. Finally, GW501516 increased the hepatic levels of the PPAR α endogenous ligand 16:0/18:1-PC and the expression of the VLDL receptor.

Conclusion: These data indicate that the hypotriglyceridemic effect of GW501516 in mice subjected to HFD-fed mice is accompanied by an increase in phospho-AMPK levels and the amplification of the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway.

© 2012 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La ingesta excesiva de calorías y la gran disponibilidad de nutrientes han permitido una continua progresión de la incidencia de la obesidad y la resistencia a la insulina, principales factores responsables del desarrollo del síndrome metabólico. Este síndrome se caracteriza por la presencia de una dislipidemia que se inicia con la sobreproducción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que transportan triglicéridos, seguida de la aparición de partículas LDL más pequeñas y densas y de una reducción en los niveles de colesterol HDL e hiperlipidemia postprandial^{1,2}. Todas estas alteraciones convierten la dislipidemia aterogénica en un factor de riesgo muy importante en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica³, razón por la cual es muy importante buscar nuevos tratamientos para reducir los niveles de triglicéridos plasmáticos.

Entre los nuevos tratamientos farmacológicos para prevenir el aumento de los niveles de triglicéridos, los ligandos de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (*peroxisome proliferator-activator receptor [PPAR]*) β/δ han despertado un gran interés en los últimos años. Los PPAR son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares hormonales que regulan la transcripción de genes implicados en diversos procesos biológicos⁴. La familia de los PPAR está formada por 3 subtipos codificados por genes independientes, PPAR α (NR1C1, según el sistema unificado de nomenclatura por la superfamilia de los receptores nucleares), PPAR β/δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3)⁵. De los 3 subtipos, PPAR α fue el primero en ser identificado y es la diana molecular de los fibratos. Este subtipo se expresa principalmente en tejidos con alta capacidad catabólica como el hígado, el tejido adiposo marrón, el riñón, el corazón y el músculo esquelético⁶. El PPAR γ tiene un patrón de distribución más restringido, expresándose principalmente en el tejido adiposo marrón y blanco, en el colon y los

macrófagos, mientras que su expresión es limitada en el músculo esquelético y el corazón. Por otro lado, el PPAR β/δ se expresa de manera ubicua, incluyendo tejidos altamente metabólicos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo, y su papel en el síndrome metabólico ha sido estudiado en los últimos años⁷⁻⁹. Entre otros efectos, el tratamiento con el ligando de PPAR β/δ de alta afinidad GW501516 ha demostrado disminuir los niveles de triglicéridos plasmáticos¹⁰. En estudios realizados en ratones deficientes en PPAR β/δ el efecto hipotrigliceridemiantre de este subtipo de receptor nuclear se ha asociado con cambios en la producción hepática y la eliminación de las VLDL¹¹, pero se desconoce si otros mecanismos podrían estar implicados. Es interesante destacar que el principal factor que determina la secreción de triglicéridos hepática es la disponibilidad de ácidos grasos¹². En el hígado, los ácidos grasos pueden ser incorporados en los triglicéridos u oxidados en el proceso de β -oxidación mitocondrial. Así, un aumento en la oxidación de los ácidos grasos en el hígado podría reducir la disponibilidad de estos ácidos grasos y, en consecuencia, reducir la secreción de triglicéridos hepáticos. Sin embargo, se desconoce si el efecto hipotrigliceridemiantre causado por la activación del PPAR β/δ supone un aumento de la β -oxidación hepática y los mecanismos implicados.

El paso limitante de la β -oxidación mitocondrial es el transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria a través de la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT1a). Este transportador de ácidos grasos se encuentra bajo control tanto de los PPAR como de la cinasa activada por adenosinmonofosfato (AMP) (*AMP-activated protein kinase [AMPK]*), que detecta niveles bajos de adenosintrifosfato (ATP) y, en respuesta, aumenta el metabolismo oxidativo¹³ reduciendo los niveles de malonil-CoA. Además, hay que destacar que la activación de PPAR β/δ puede aumentar la actividad de la AMPK y que el tratamiento en células de músculo esquelético humanas con GW501516 puede

aumentar la oxidación de los ácidos grasos a través de PPAR β/δ y la AMPK¹⁴.

Recientemente se ha descrito el papel de una nueva proteína, la lipina 1, que determina si los ácidos grasos son incorporados a los triglicéridos o son conducidos hacia la β -oxidación mitocondrial. La expresión y la localización de la lipina 1 controlan la secreción de los triglicéridos hepáticos¹⁵. Así, en el citoplasma, la lipina 1 promueve la acumulación de triglicéridos y la síntesis de fosfolípidos actuando como una fosfatasa del ácido fosfatídico dependiente de Mg²⁺ (*phosphatidic acid phosphatase-1* [PAP1]). Por otro lado, cuando la lipina 1 se localiza en el núcleo actúa como un co-activador transcripcional ligado a la oxidación de los ácidos grasos que regula la inducción de genes diana del complejo PGC1 α -PPAR α ¹⁶. La lipina 1 induce la expresión de genes diana de PPAR α y forma un complejo junto con PPAR α y PGC1 α , permitiendo la inducción de genes diana implicados en la oxidación de ácidos grasos, tales como *Cpt1a* y la deshidrogenasa de acil-CoA de cadena media (*medium chain acyl-CoA dehydrogenase* [*Mcad*])¹⁶.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar los efectos del activador de PPAR β/δ GW501516 sobre la hipertriglyceridemia inducida por una dieta rica en grasa (*high fat diet* [HFD]) y sus efectos sobre la β -oxidación hepática.

Métodos

El ligando de PPAR β/δ GW501516 se obtuvo de Alexis Biochemicals (Lausen, Suiza). [γ -³²P]dATP (3000Ci/mmol) fue proporcionado por Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EE. UU.). El resto de productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Animales

Ratones de 5 semanas de edad se mantuvieron bajo condiciones estándar de iluminación (ciclos de 12 h luz/oscuridad) y de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) y se alimentaron con dieta estándar (Harlan, Barcelona, España) durante 5 días antes del inicio del estudio. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos experimentales (n=12 cada uno): uno alimentado con dieta estándar, otro alimentado con dieta rica en grasas tipo Western (HFD, 35% grasa por peso, 58% kcal en grasa, Harlan Ibérica S.A., Barcelona, España) más una dosis diaria por sonda oral de vehículo (0,5% w/v carboximetilcelulosa de viscosidad media), y animales alimentados con HFD más una dosis diaria por sonda oral de 3 mg/kg/día del agonista de PPAR β/δ GW501516 disuelto en el vehículo. Antes del término del tratamiento se realizó un test de tolerancia a la glucosa a los ratones en ayunas durante 4 h. Los animales recibieron 2 g/kg por peso corporal de glucosa vía intraperitoneal y se recolectaron muestras de sangre a los 0, 20, 40 y 90 min. El peso corporal de los ratones y el consumo de dieta fue comprobado regularmente durante el periodo de tratamiento. Tras 3 semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados utilizando isoflurano como anestesia. Tras la recolección de sangre, se analizaron los niveles plasmáticos de triglicéridos, glucosa (Bayer Ibérica, Sant Joan Despí, España), colesterol, ácidos grasos libres (Wako, Japón), insulina (Amersham), adiponectina y leptina (Linco, St. Charles, MO, EE. UU.). Las muestras de hígado se

congelaron en nitrógeno líquido y fueron guardadas a -80°C . Estos experimentos se realizaron conforme a la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* publicada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, revisada en 1996). Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Bioética de la Universidad de Barcelona, como indica la Ley 5/21 de julio de 1995 aprobada por la Generalitat de Cataluña.

Análisis de los niveles de ARNm

Los niveles de ARNm se estudiaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) tal como se ha descrito previamente¹⁷. El ARN total se aisló utilizando el reactivo Ultraspec (Bioteck, Houston, EE. UU.). El ARN total aislado mediante este método no está degradado y está libre de contaminaciones por ADN o proteínas. Las secuencias de los primers sentido y antisentido utilizados para la amplificación fueron: *Lipina 1*, 5'-CTGCAGACAGGTTGACGCCAA-3' y 5'-TCTGGTGGATGAGC-AGTCCCC-3'; *Pgc-1 α* , 5'-CCCGTGGATGAAGACGGATTG-3' y 5'-GTGGGTGTGGTTGCTGCATG-3'; *Ppar α* , 5'-GGCTCGG-AGGGCTCTGTCAATC-3' y 5'-ACATGCACTGGCAGCAGTGG-3'; *Cpt1a*, 5'-TATGTGAGGATGCTGCTT-3' y 5'-CTCGGAG-AGCTAACGTTG-3'; *Mcad*, 5'-TGGAAAGCGGCTACAAGCAG-3' y 5'-CACCGCAGCTTCCCGAATGT-3'; *Cte* (*cytosolic thioesterase*) 5'-CAGCCACCCCAGGGTAAAGG-3' y 5'-CC-TTGAGGCCATCCTGGTCA-3'; *Cept1* (*cholineethanolamine phosphotransferase*) 5'-GCTAGGTGAGCCGCTCAGTGC-3' y 5'-ATGGTGCCCTCCTCGTGACTG-3'; receptor de las Vldl (*Vldl-r*) 5'-GTTCAAGTGCAGAACGGGGGA-3' y 5'-CCGGGTT-TTGGCATTCAAA-3'; y *Aprt* (*adenosyl phosphoribosyl transferase*), 5'-AGCTTCCGGACTTCCCCATC-3' y 5'-GAC-CACTTCTGCCCGGTTTC-3'. La amplificación de cada gen reveló una única banda de tamaño esperado: (*lipina 1*: 225 pb, *Pgc-1 α* : 228 pb, *Ppar α* : 654 pb, *Cpt-1a*: 629 pb, *Mcad*: 216 pb, *Cte*: 244 pb, *Cept1*: 233 pb, *Vldl-r*: 227 pb, y *Aprt*: 329 pb). Se llevaron a cabo experimentos preliminares para cada uno de los genes estudiados con varias cantidades de ADNc para determinar las condiciones no saturantes de la amplificación por PCR. Entonces, bajo estas condiciones, se evaluó la cuantificación relativa del ARNm por el método RT-PCR utilizado en este estudio¹⁸. Las bandas radiactivas se cuantificaron por escáner vídeo-densitométrico (Vilbert Lourmat Imaging). Los resultados para la expresión de los ARNm específicos siempre se presentan en relación con la expresión del gen control (*Aprt*).

Aislamiento de extractos nucleares

Los extractos nucleares se obtuvieron como se ha descrito previamente¹⁷.

Ensayo de retardación de la movilidad electroforética

El ensayo de retardación de la movilidad electroforética (*electrophoretic mobility shift assay* [EMSA]) se realizó usando una doble cadena de oligonucleótidos para la unión consenso de PPAR (sonda PPRE;

5'CAAAACTAGGTCAAAGGTCA-3', Sta. Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), como se ha descrito previamente¹⁹.

Western-blot

Para la obtención de proteína total el hígado de los ratones fue homogeneizado en tampón de lisis frío (Tris-HCl 5 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, fenilmetsulfonil floruro 0,1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, aprotinina 5,4 µg/ml). El homogeneizado fue centrifugado a 16,700 × g durante 30 min a 4°C. La concentración de proteína fue medida por el método Bradford. Los extractos proteicos se separaron por SDS-PAGE en geles de 10% y se transfirieron a una membrana immobilen-polivinilideno-dioflurada (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Los análisis de western-blot se realizaron usando los anticuerpos contra AMPK, AMPK fosforilada Th¹⁷², ERK1/2, ERK1/2 fosforilada (Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.), lipina 1, PPAR α , lamina B (Santa Cruz Biotechnologies) y β -actina (Sigma). La detección de estos anticuerpos se realizó con el kit de quimioluminiscencia EZ-ECL (Amersham). El tamaño de las proteínas detectadas se estimó basándose en marcadores estándar de peso molecular (Invitrogen, Barcelona, España).

Análisis de 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (16:0/18; 1-PC)

Los lípidos totales de los homogeneizados de hígado se extrajeron por el método Bligh & Dyer²⁰, se evaporaron y se disolvieron en metanol/agua (9:1). La separación total de los lípidos, la identificación y la cuantificación se llevaron a cabo por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas usando una bomba binaria Hitachi LaChrom Elite L-2130 y un inyector automático Hitachi L-2200 (Merck) acoplado con un espectrómetro de masas Bruker Esquire6000 con trampa de iones^{21,22}. El efluente se dividió introduciendo 0,2 ml/min en el interfaz de eletropulverización del espectrómetro de masas. El nebulizador se estableció a 30 psi, el gas de secado a 8 l/min y la temperatura de secado a 350°C. La columna usada fue una Supelcosil LC-18 de 5 µm de tamaño de partícula, 250 × 2,1 mm (Sigma-Aldrich) protegida con un cartucho Supelguard LC-18 de 20 × 2,1 mm (Sigma-Aldrich). La fase móvil usada fue un gradiente del solvente A (metanol/agua/hexano/hidróxido de amonio, 87,5:10,5:1,5:0,5 v/v/v/v), del solvente B (metanol/hexano/hidróxido de amonio, 87,5:12:0,5 v/v/v) y del solvente C (metanol/agua, 9:1 v/v). El gradiente comenzó al 100% de A, disminuyó linealmente al 50% de A (50% B) en 17,5 min, y al 0% A (100% B) en 12,5 min, mantenido al 100% de B durante 5 min y entonces modificado a 100% de C en 3 min, mantenido 9 min y modificado a 100% B en 3 min. La velocidad de flujo fue 0,5 ml/min y el volumen de inyección, 80 µl. La adquisición de datos se llevó a cabo en el modo de exploración completa y positiva, detectando las especies de PC como iones [M+H]⁺ con la corriente del capilar a -4000 V. La fosfatidilcolina (PC) (16:0/18:1) fue caracterizada por espectroscopia de masas en tandem en monitorización de reacción múltiple y en modo negativo, con una adición post-columna de ácido acético para la formación del aducto [M+CH₃CO₂] (100 µl/h). Como estándar

interno para la curva de calibración y para la cuantificación se utilizó 1,2-dinonadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (m/z = 818,6).

Determinación de adenosintrifosfato, adenosindifosfato y adenosinmonofosfato por cromatografía líquida de alta eficacia

Los nucleótidos de adenina fueron separados por cromatografía líquida de alta eficacia usando una columna X-Bridge con un diámetro exterior de 3,5 µm (100 × 4,6 cm). La elución fue realizada con dihidrógeno fosfato de potasio 0,1 mM, pH 6, conteniendo hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio 4 mM y el 15% (v/v) de metanol. Las condiciones fueron las siguientes: 20 µl de inyección de muestra, columna a temperatura ambiente, velocidad de flujo a 0,6 ml/min y UV a 260 nm.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± desviación estándar de 5 experimentos separados. Las diferencias significativas se establecieron por ANOVA de una vía, utilizando el programa GraphPad InStat (Software GraphPad V2.03) (GraphPad Software, CA, EE.UU.). Cuando se encontraron variaciones significativas se aplicó el test de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de p < 0,05.

Resultados

Efectos del tratamiento con GW501516 sobre los niveles de triglicéridos plasmáticos, el contenido de triglicéridos hepático y el test de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con la dieta rica en grasa

La mayoría de estudios realizados con agonistas de PPAR β/δ están basados en tratamientos a largo plazo, permitiendo una importante reducción de peso y de grasa^{23,24}, efectos que repercuten sobre el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina. Para prevenir la interferencia que provoca la pérdida de peso en los parámetros analizados, en este estudio los ratones fueron tratados con el agonista de PPAR β/δ durante 3 semanas. Tras este período, los ratones que recibieron la HFD o la HFD más el tratamiento con GW501516 no mostraron diferencias significativas en el peso corporal en comparación con los ratones control (control: 30,4 ± 2,8 g, HFD: 30,0 ± 2,5 g, y HFD + GW501516: 31,4 ± 2,7 g), y el consumo de comida fue similar en todos los grupos (resultados no mostrados). Además, los ratones alimentados con la HFD o la HFD más GW501516 no mostraron cambios significativos entre los niveles plasmáticos de colesterol total, glucosa, insulina, adiponectina, leptina o ácidos grasos no esterificados comparados con los ratones control (resultados no mostrados). Por el contrario, los ratones alimentados con HFD mostraron un aumento de los niveles de triglicéridos comparados con los animales control (55 ± 2,5 vs. 123 ± 29 mg/dl, inducción de 2,2 veces, p < 0,05), mientras que este aumento fue evitado por el tratamiento con GW501516 (69 ± 16 mg/dl, p < 0,01 vs. ratones HFD) (fig. 1A).

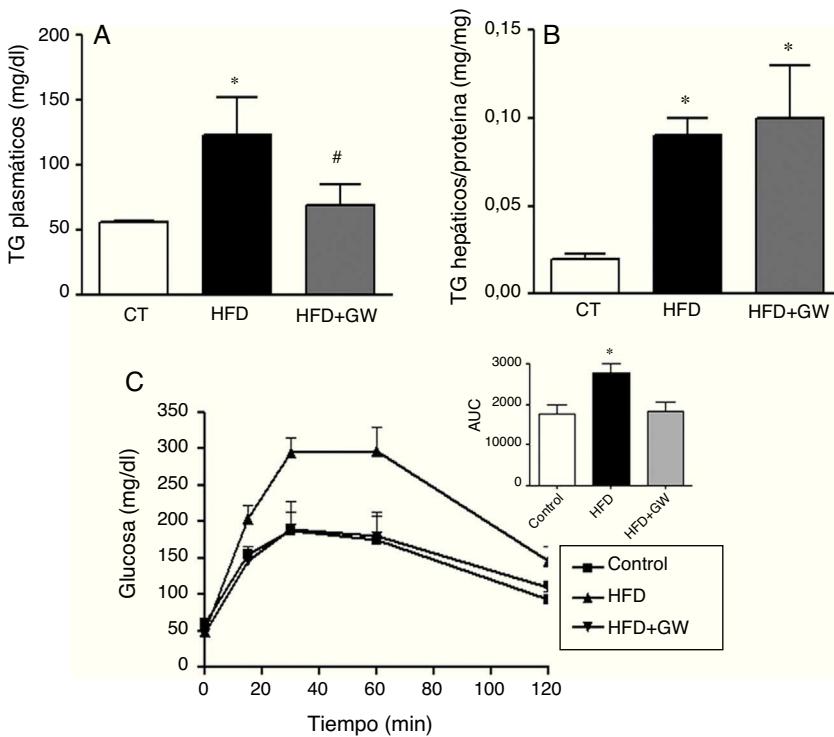


Figura 1 El tratamiento con GW501516 previene la hipertrigliceridemia y la intolerancia a la glucosa en ratones alimentados con la HFD. Los ratones fueron alimentados con una dieta estándar o con la HFD con o sin GW501516 (3 mg/kg/día) durante 3 semanas. A) Niveles de triglicéridos plasmáticos. B) Contenido de triglicéridos hepáticos. C) Test de tolerancia a la glucosa y área bajo la curva (AUC). Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=5$). * $p < 0,05$ vs ratones control; # $p < 0,05$ vs ratones alimentados con la HFD.

La HFD también aumentó el contenido de triglicéridos en el hígado (inducción de 4,5 veces, $p < 0,05$) (fig. 1B). Por otro lado, el tratamiento con el fármaco no afectó este parámetro, coincidiendo con un estudio previo⁹. Al realizar el test de tolerancia a la glucosa, que evalúa la capacidad de organismo de ajustar los niveles de glucosa tras una inyección aguda de glucosa, los niveles de glucosa de los animales control mostraron un pico a los 30 min y volvieron a niveles basales (fig. 1C). Como era esperado, los ratones alimentados con la HFD mostraron intolerancia a la glucosa, tal como se demuestra por el aumento significativo en el área bajo la curva (AUC). Por el contrario, los ratones alimentados con la HFD y tratados con GW501516 mostraron una mejor respuesta al cambio de la glucosa, y el AUC del test de tolerancia a la glucosa fue similar al de los ratones control.

El tratamiento con GW501516 restaura la expresión de PGC-1 α y aumenta la lipina 1 nuclear en el hígado de ratones alimentados con la dieta rica en grasa

Para entender los efectos de la activación de PPAR β/δ sobre los ácidos grasos, si eran incorporados a los triglicéridos o por el contrario eran oxidados, se analizaron los niveles de lipina 1, enzima que se encuentra bajo el control de la AMPK²⁵. La HFD disminuyó notablemente los niveles hepáticos de expresión génica de la lipina 1 en comparación con los ratones alimentados con la dieta estándar, reducción que no se observó en los ratones tratados con el activador

de PPAR β/δ (fig. 2A). Los niveles proteicos de lipina 1 citosólicos no se modificaron de manera significativa por la HFD o por el tratamiento con el fármaco (fig. 2B). Por el contrario, GW501516 aumentó los niveles proteicos de lipina 1 en el núcleo (fig. 2C), donde actúa como co-activador transcripcional ligado a la oxidación de los ácidos grasos¹⁶. Además, la expresión hepática del co-activador Pgc-1 α , implicado en la β -oxidación, disminuyó tras la alimentación con la HFD, pero esta reducción no se observó tras el tratamiento con GW501516 (fig. 2D).

El tratamiento con GW501516 aumenta la expresión y la actividad de PPAR α y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado de los ratones alimentados con la dieta rica en grasa

Se ha descrito que la sobreexpresión de lipina 1 puede aumentar la expresión génica de Ppar α y de sus genes diana como Cpt1a y Mcad, por lo que estudiamos si el aumento de lipina 1 nuclear causado por GW501516 era responsable de estos cambios. Así, GW501516 aumentó los niveles génicos y de proteína nuclear de PPAR α (resultados no mostrados). Además, dado que se ha demostrado que la lipina 1 activa la transcripción de PPAR α en cooperación con PGC-1 α ¹⁶, realizamos un EMSA para examinar el efecto del tratamiento con GW501516 sobre la actividad de unión al ADN de PPAR α . La sonda PPRE formó 2 complejos principales (I y II) con las proteínas nucleares hepáticas (fig. 3A). La especificidad de estos 2 complejos se comprobó realizando

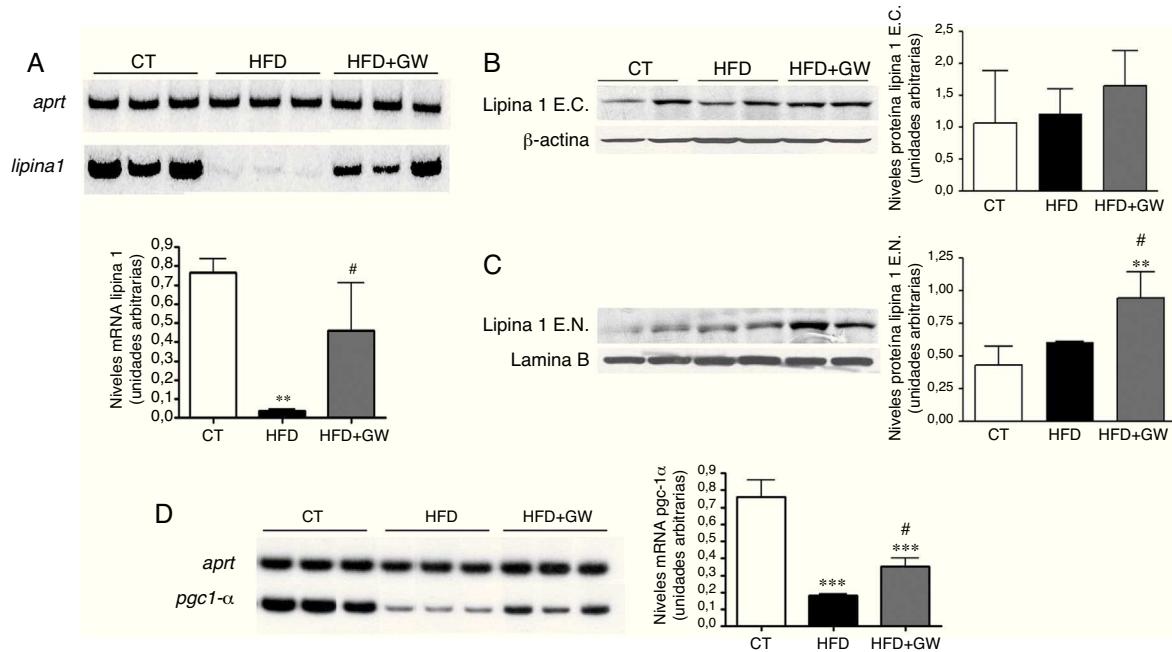


Figura 2 El tratamiento con GW501516 aumenta los niveles de lipina 1 nuclear en el hígado de ratones alimentados con la HFD. A) Niveles de ARNm de *lipina 1*. Autoradiografía representativa y cuantificación normalizada respecto a los niveles de ARNm del gen control *Aprt*. Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=5$). Niveles proteicos de lipina 1 citosólica (B) y nuclear (C) en el hígado. Como control de carga se utilizó β -actina (extractos citosólicos) y lamina B (extractos nucleares). D) Niveles de ARNm de *Pgc-1 α* . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs ratones control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs ratones alimentados con la HFD.

un experimento de competición añadiendo un exceso de sonda PPRE no marcada. La actividad de unión al ADN de PPAR α fue mayor en los ratones alimentados con la HFD más GW501516 que en los ratones control y los alimentados con la HFD. Además, el anticuerpo contra PPAR α dio lugar a un retardo (*supershift*) de la migración del complejo II, indicando así la presencia de PPAR α . Por el contrario, no se observó ningún *supershift* cuando se adicionó un anticuerpo contra PPAR β/δ . En concordancia con el aumento de expresión de *Ppar α* y de su actividad de unión al ADN, el tratamiento con GW501516 incrementó la expresión de los genes diana de PPAR *Mcad*, *Cte* y *Cpt1a* en comparación al control y a los ratones alimentados con la HFD (fig. 3B-D). En concordancia con el aumento de expresión de los genes diana de PPAR implicados en la oxidación de los ácidos grasos, los niveles de β -hidroxibutirato, un producto de la cetogénesis usado como marcador de la oxidación de ácidos grasos hepática, aumentó significativamente en los ratones que recibieron la HFD más el tratamiento con GW501516 (fig. 3E). En conjunto, estos resultados indican que GW501516, al igual que la sobreexpresión de lipina 1¹⁶, es capaz de amplificar la vía PPAR α -PGC-1 α en el hígado y así aumentar la oxidación hepática de ácidos grasos.

El tratamiento con GW501516 aumenta los niveles hepáticos del ligando endógeno de PPAR α 16:0/18:1-PC en los ratones alimentados con la dieta rica en grasa

El aumento de la vía PPAR α por el tratamiento con GW501516 parecía ser mayor de lo esperado considerando el aumento observado en la lipina 1, por lo que decidimos buscar un

mecanismo adicional que contribuyera a los efectos causador por GW501516. Recientemente se ha identificado un nuevo ligando endógeno de PPAR α , la 16:0/18:1-PC (fosfatidilcolina)²⁶. En estudios de células de hepatoma la sobreexpresión de *Cept1*, gen que codifica para la enzima responsable de la síntesis de este ligando, produce la activación de PPAR α y de sus genes diana como la *Cpt1a*²⁶. En primer lugar determinamos si el tratamiento con GW501516 había afectado la expresión de *Cept1*. Tanto la HFD como la HFD más GW501516 aumentaron la expresión de *Cept1*, pero el aumento atribuido a GW501516 fue mayor que el causado por la HFD sola (fig. 4A). Además, cuando se analizaron los niveles del ligando 16:0/18:1-PC solamente los ratones que recibieron GW501516 mostraron niveles aumentados de este ligando endógeno de PPAR α (fig. 4B).

El tratamiento con GW501516 restaura los niveles de AMPK fosforilada e incrementa el ratio adenosinmonofosfato/adenosintrifosfato en el hígado de ratones alimentados con la dieta rica en grasa

Dado el importante papel regulador de la AMPK en la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y el hecho de que esta cinasa puede regular la expresión de *lipina 1*²⁵ y *Pgc-1 α* ²⁷, analizamos los niveles hepáticos de la AMPK fosforilada y total. De acuerdo con estudios anteriores²⁸, la HFD disminuyó los niveles de la AMPK fosforilada en el hígado (fig. 5A). Además, el tratamiento con GW501516 evitó esta reducción. Se ha descrito que existe una inhibición recíproca entre AMPK y ERK1/2²⁹, y que la inhibición de AMPK aumenta la fosforilación de ERK1/2 en el hígado³⁰, por lo que

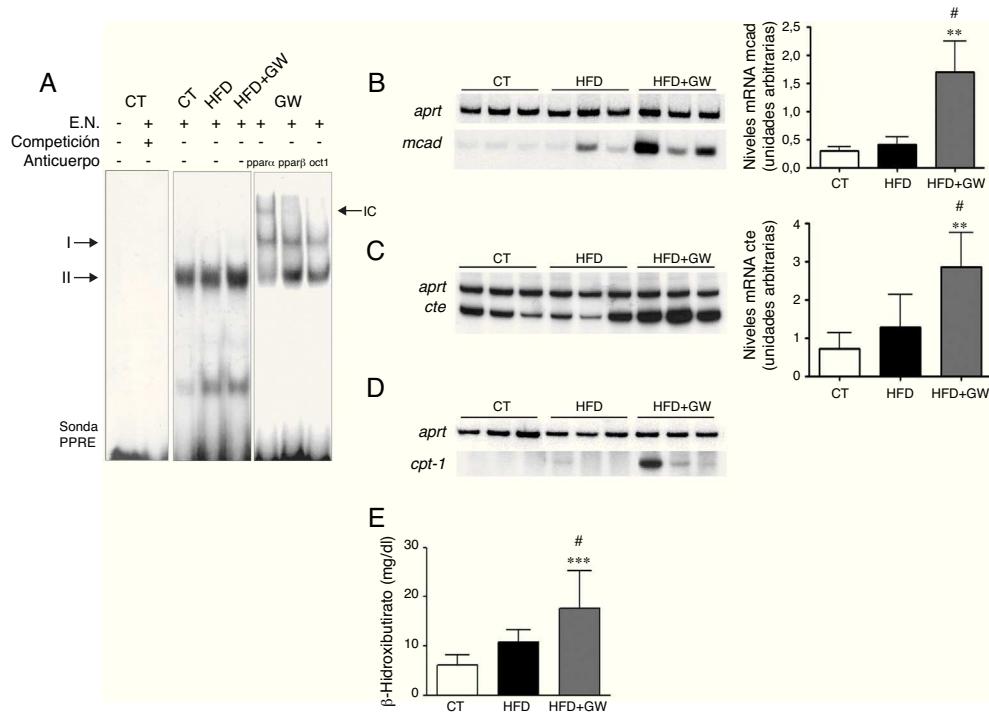


Figura 3 El tratamiento con GW501516 aumenta la expresión y la actividad de unión al ADN de PPAR α y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado de ratones alimentados con la HFD. A) Autoradiografía de EMSA con sonda PPRE marcada con ^{32}P y con extractos nucleares. Según la competición con un exceso de sonda no marcada se formaron 2 complejos específicos (I y II). Se realizó análisis de supershift incubando con anticuerpos contra PPAR α , PPAR β y Oct1. IC: inmunocomplejo. Efectos del GW501516 sobre los niveles de ARNm de la *Mcad* (B), la *Cte* (C) y la *Cpt1a* (D) y niveles plasmáticos de β -hidroxibutirato (E). Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs ratones control; # $p < 0,05$ vs ratones alimentados con la HFD.

examinamos el estado de esta cinasa. La reducción de la AMPK fosforilada observada en los ratones alimentados con HFD iba acompañada por un aumento en los niveles de ERK1/2 fosforilada, pero este aumento fue atenuado por el tratamiento de GW501516 (fig. 5B). Dado que la AMPK puede ser regulada alostéricamente por AMP³¹ y está descrito que PPAR β/δ puede interferir en la cadena respiratoria produciendo una reducción de ATP y, por tanto, un aumento de la relación AMP/ATP¹⁴, determinamos las concentraciones del nucleótido adenina por cromatografía líquida de alta eficacia para examinar la relación AMP/ATP y ATP/ADP (adenosindifosfato). El tratamiento con GW501516 aumentó la relación AMP/ATP (fig. 5C) en el hígado además de disminuir la relación ATP/ADP (fig. 5D) en comparación a los animales control y los alimentados con la HFD, indicando así que el mecanismo responsable del aumento de la fosforilación de la AMPK inducido por GW501516 se podría deber a un cambio en el estado energético del hepatocito.

El tratamiento con GW501516 aumenta la expresión del receptor hepático de las lipoproteínas de muy baja densidad en ratones alimentados con la dieta rica en grasa

El aumento observado en la oxidación de los ácidos grasos causado por GW501516 muestra una aparente

controversia con la acumulación de triglicéridos hepáticos causado por este fármaco. Aunque se ha descrito que esta acumulación podría ser el resultado de un aumento en el flujo de glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato y el aumento de la síntesis de ácidos grasos causado por GW501516⁹, decidimos estudiar si había otros mecanismos adicionales involucrados. Recientemente se ha descrito que el receptor de las VLDL se encuentra regulado por PPAR β/δ ³² y que su expresión puede aumentar por acción de la AMPK³³. Este receptor se expresa de manera abundante en el corazón, el músculo esquelético y el tejido adiposo, pero solo en trazas en el hígado³⁴. Además, en estudios *in vitro* se ha demostrado que el receptor de las VLDL une e internaliza lipoproteínas ricas en triglicéridos, incluyendo las VLDL, en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, reduciendo así los niveles de triglicéridos plasmáticos³⁵. En concordancia con estos datos, la expresión del receptor de VLDL era muy notable en el músculo esquelético (fig. 6A) y ausente en el hígado (fig. 6B) de los animales control. Sorprendentemente, el tratamiento con GW501516 no afectó la expresión de este receptor en el músculo esquelético, pero sí en el hígado (fig. 6). Estos resultados contribuyen a explicar tanto la reducción de los triglicéridos plasmáticos como la falta de reducción en el contenido de triglicéridos hepáticos tras el tratamiento con GW501516, como resultado de un aumento en la captación de los triglicéridos del plasma.

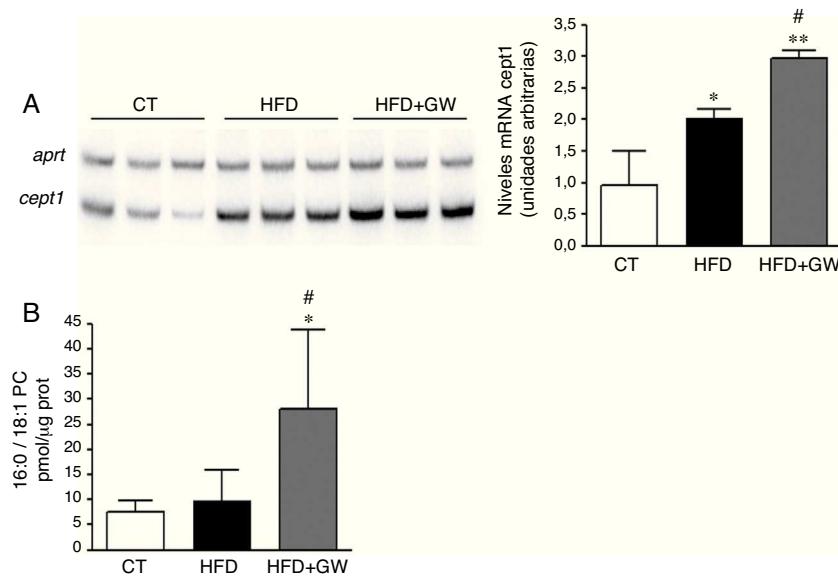


Figura 4 El tratamiento con GW501516 aumenta los niveles del ligando endógeno de PPAR α 16:0/18:1-PC en ratones alimentados con la HFD. A) Niveles de ARNm de la *Cept-1*. Autorradiografía representativa y cuantificación normalizada con niveles de ARNm del gen control *Appt*. Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=5$). B) Cuantificación del ligando 16:0/18:1-PC en extractos nucleares de hígado. Resultados expresados como la media \pm DE ($n=5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs ratones control; # $p < 0,05$ vs ratones alimentados con la HFD.

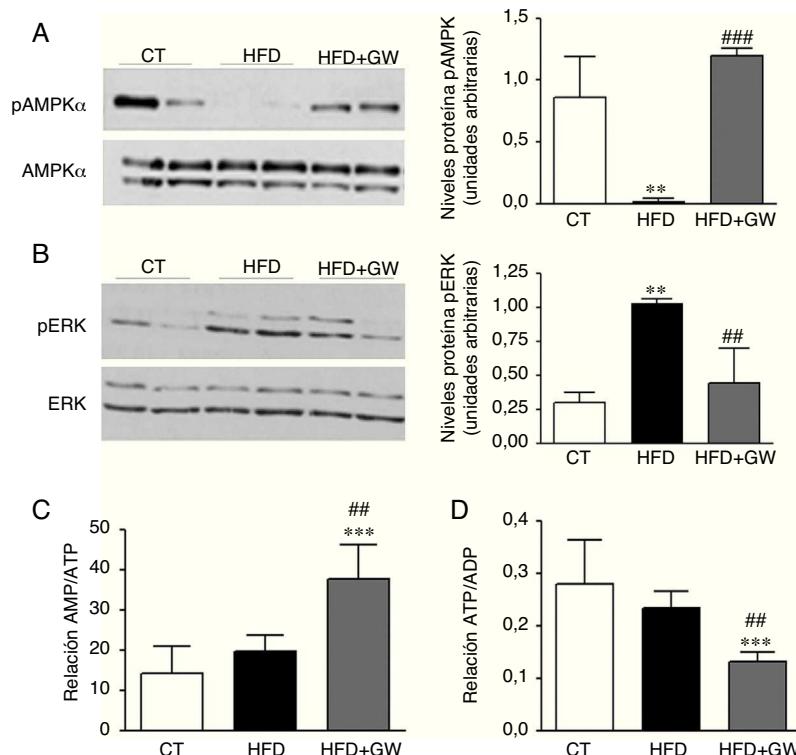


Figura 5 El tratamiento con GW501516 evita la reducción de la AMPK fosforilada e incrementa la relación AMP/ATP. Niveles proteicos de la AMPK fosforilada (A) y la ERK1/2 fosforilada (B). Resultados expresados como la media \pm DE ($n=3$). Relación AMP/ATP (C) y ATP/ADP (D) en el hígado. Resultados expresados como la media \pm DE ($n=5$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs ratones control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs ratones alimentados con la HFD.

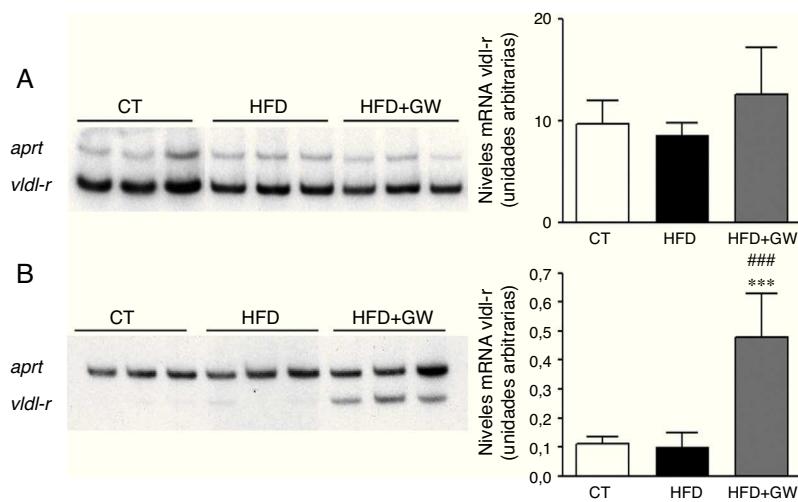


Figura 6 El tratamiento con GW501516 aumenta los niveles de ARNm del receptor de las VDL en el hígado. Niveles de ARNm del receptor de las VDL en el músculo esquelético (A) y en el hígado (B). Autorradiografía representativa y cuantificación normalizada con niveles de ARNm del gen control *Aprt*. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n = 5). ***p < 0,001 vs ratones control; #####p < 0,001 vs ratones alimentados con la HFD.

Discusión

El consumo excesivo de grasas puede producir un desequilibrio en el metabolismo lipídico hepático provocando un incremento de la producción y liberación de lipoproteínas, alteración asociada al desarrollo de trastornos metabólicos como la obesidad, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. La utilización del agonista de PPAR β/δ GW501516 ha demostrado en diversos estudios animales¹⁰, e incluso en humanos³⁶, un efecto hipotriglyceridemiantre de este fármaco, lo que sugería que podría ser útil para el tratamiento de estos trastornos. En este estudio se evaluó el efecto del activador de PPAR β/δ GW501516 sobre su capacidad de regular la oxidación de los ácidos grasos en el hígado de ratones alimentados con una dieta rica en grasas (HFD). Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con GW501516 previene el desarrollo de hipertriglyceridemia causada por la HFD. Además, estos datos muestran que el tratamiento con este activador de PPAR β/δ previene la reducción hepática de los niveles de la AMPK fosforilada inducida por la HFD y aumenta la oxidación de los ácidos grasos en el hígado por amplificación de la actividad de la vía lipina 1-PPAR α -PGC-1 α .

A diferencia de la mayoría de los estudios donde la exposición a la HFD es a más largo plazo (14-18 semanas), en nuestro estudio los ratones fueron alimentados con una HFD durante un período corto (3 semanas) para observar mejor los cambios iniciales que producen el desequilibrio metabólico causado por esta dieta. La administración de la HFD provocó en los ratones hipertriglyceridemia e intolerancia a la glucosa, pero no se observaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, leptina o adiponectina, hecho que indicaba que en nuestras condiciones la HFD no indujo señales derivadas del tejido adiposo que interfirieran sobre el metabolismo hepático. En cambio, los resultados mostraron que el tratamiento con GW501516 era capaz de evitar el desarrollo de la hipertriglyceridemia causada por la HFD. Además, se observó una mejora en

la sensibilidad a la insulina en los ratones tratados con el agonista de PPAR β/δ .

Los ratones alimentados con la HFD mostraron una reducción de los niveles hepáticos de la AMPK fosforilada que se evitó por la administración de GW501516. El mantenimiento de la AMPK fosforilada fue acompañado por la recuperación de los niveles de expresión génica hepáticos de *lipina 1* y *Pgc-1 α* y por el aumento de los niveles de ARNm del receptor de VLDL. Aunque no se puede descartar un efecto directo en la activación transcripcional de estos genes por PPAR β/δ , ya que se ha descrito que *lipina 1*, el receptor de las VLDL y *Pgc-1 α* son genes diana de PPAR β/δ , la mayoría de los efectos de GW501516 serían atribuibles al aumento de la fosforilación de la AMPK¹⁴. De hecho, se ha descrito que esta cinasa puede regular la expresión de *lipina 1*²⁵, el receptor de las VLDL³³ y *Pgc-1 α* ²⁷. Por otro lado, se ha descrito una inhibición recíproca entre ERK1/2 y AMPK²⁹, por lo que el aumento en los niveles de la AMPK fosforilada podría ser el resultado de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 causada por GW501516, resultado que coincide con estudios previos donde GW501516 prevenía la fosforilación de ERK1/2 inducida por LPS en adipocitos³⁷. Es importante resaltar que un estudio anterior muestra que la presencia de obesidad permite el aumento de actividad en la ERK1/2 en el hígado y que la restricción calórica inhibe este aumento y mejora la sensibilidad a la insulina³⁸. En nuestro estudio la mejoría en la tolerancia a la glucosa causada por GW501516 también iba acompañada de una reducción en los niveles de fosforilación de la ERK1/2.

Asimismo, en este estudio mostramos que GW501516 aumenta la relación AMP/ATP en el hígado, indicando que, de acuerdo a un estudio anterior realizado en células de músculo esquelético¹⁴, el aumento de la fosforilación de la AMPK se debería a un cambio en el estado energético de la célula. Estudios previos sugieren que la reducción de los niveles de ATP causado por GW501516 podría deberse a una inhibición específica de uno o más complejos de la cadena respiratoria, un efecto sobre la síntesis de ATP o el

desacoplamiento mitocondrial¹⁴, cambios que reducirían los niveles de ATP generados por la mitocondria y permitirían la activación de la AMPK.

Como se ha comentado anteriormente, la activación de la AMPK puede regular la expresión de *lipina 1* y *Pgc-1α*. Además, la lipina 1 puede actuar como co-activador transcripcional interaccionando directamente con los receptores nucleares PPAR α y PGC-1 α ¹⁵, activando así genes implicados en la fosforilación oxidativa mitocondrial y de los ácidos grasos. En nuestro estudio el tratamiento con GW501516, en consonancia con la recuperación de los niveles de la AMPK, evitó la reducción de PGC-1 α y aumentó los niveles de lipina 1 nuclear, permitiendo la amplificación de la vía PGC-1 α -PPAR α , hecho que se demuestra tanto por el aumento de la expresión génica como de la actividad de unión al ADN de PPAR α . Además, el tratamiento con GW501516 aumentó la expresión de una serie de genes diana de PPAR α implicados en la oxidación de los ácidos grasos, como son la *Mcad*, la *Cte* y la *Cpt1a*. Asimismo, el tratamiento farmacológico aumentó los niveles plasmáticos de β -hidroxibutirato, uno de los productos finales de la β -oxidación hepática. Por otro lado, la activación de PPAR α también podría ser consecuencia de un aumento de los niveles de sus ligandos endógenos como es el 16:0/18:1-PC, el cual presentaba niveles nucleares aumentados en los animales tratados con GW501516. Finalmente, todos estos resultados muestran que el agonista de PPAR β/δ GW501516 previene la reducción de la AMPK, de PGC-1 α y de la lipina 1, amplifica la vía PPAR α y aumenta la oxidación de los ácidos grasos, cambios que pueden contribuir a reducir la secreción hepática de triglicéridos y, en consecuencia, los niveles de triglicéridos plasmáticos.

Sorprendentemente, en contradicción aparente con el aumento de la oxidación de los ácidos grasos, los animales tratados con GW501516 presentaban una acumulación hepática de triglicéridos similar a la observada en los animales que solo recibieron la HFD. Esta acumulación de lípidos se podría explicar por diversas razones. En primer lugar se ha demostrado que la sobreexpresión hepática de *lipina 1* reduce la secreción de triglicéridos secuestrándolos en el hígado¹⁶. Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente, el tratamiento con GW501516 aumentó los niveles del receptor de las VLDL. Este aumento podría contribuir al efecto hipotrigliceridemiantre del GW501516, ya que podría aumentar la captación de VLDL del plasma, retirándolas de la circulación sanguínea para su almacenaje u oxidación en el hígado. Finalmente, otro hecho que explicaría la acumulación de triglicéridos hepáticos podría ser la capacidad de GW501516 para inducir la síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa en el hígado, tal y como ha sido demostrado por Lee et al.²⁷ A pesar de ello, según este mismo estudio, este efecto podría deberse a la duración del tratamiento, ya que no se observó hígado graso en un tratamiento de 6 meses con GW501516. Así pues, se podría pensar que a largo plazo la oxidación de los ácidos grasos hepática activada por GW501516 sería capaz de reducir tanto los triglicéridos circulantes como los acumulados en el hígado. Además, recientemente se ha demostrado que la activación de PPAR β/δ en el hígado produce acumulación de lípidos mayoritariamente en forma de ácidos grasos monoinsaturados en detrimento de los ácidos grasos saturados mucho más lipotóxicos³⁹.

Responsabilidades éticas

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Financiación

Este estudio se financió parcialmente por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2009-06939 y BFU2010-18826) y por el Centro de Investigación Biomédica en Red Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

Autoría

Emma Barroso y Manuel Vázquez-Carrera se encargaron del diseño de los experimentos, de la recogida de datos y de la interpretación de estos, así como de la redacción, la revisión y la aprobación del contenido del artículo. Alma Astudillo y Jesús Balsinde recogieron datos y contribuyeron a su interpretación.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. Am J Cardiol. 1998;81:18B-25B.
- Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28:1225-36.
- Bertoni AG, Saydah S, Brancati FL. Diabetes and the risk of infection-related mortality in the U.S. Diabetes Care. 2001;24:1044-9.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. Nature. 2000;405:421-4.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacol Rev. 2006;58:726-41.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology. 1996;137:354-66.
- Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:303-8.

8. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, et al. Growth, adipose, brain and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta). *Mol Cell Biol*. 2000;20:5119–28.
9. Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, et al. PPAR-delta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:3444–9.
10. Oliver Jr WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5306–11.
11. Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM, Brewer Jr HB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem*. 2004;279:20874–81.
12. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:146–53.
13. Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*. 2009;9:407–16.
14. Kramer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, Krook A. Role of AMP kinase and PPAR-delta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2007;282:19313–20.
15. Bou KM, Sundaram M, Zhang HY, Links PH, Raven JF, Manmontri B, et al. The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL. *J Lipid Res*. 2009;50:47–58.
16. Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, et al. Lipin1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metabolism*. 2006;4:199–210.
17. Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Coll T, Sanchez RM, Merlos M, et al. Atorvastatin prevents carbohydrate response element binding protein activation in the fructose-fed rat by activating protein kinase A. *Hepatology*. 2009;49:106–15.
18. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999;26:112–5.
19. Coll T, Alvarez-Guardia D, Barroso E, Gomez-Foix A, Palomer X, Laguna JC, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 2010;151:1560–9.
20. Bligh EG, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911–7.
21. Balgoma D, Montero O, Balboa MA, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2-mediated formation of 1,2-diarachidonoyl-glycerophosphoinositol in monocytes. *FEBS J*. 2008;275:6180–91.
22. Balgoma D, Astudillo AM, Perez-Chacon G, Montero O, Balboa MA, Balsinde J. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonate-containing phospholipids. *J Immunol*. 2010;184:3857–65.
23. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR-delta. *PLoS Biol*. 2004;2:e294.
24. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113:159–70.
25. Higashida K, Higuchi M, Terada S. Potential role of lipin-1 in exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374:587–91.
26. Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J, et al. Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR-alpha in liver. *Cell*. 2009;138:476–88.
27. Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR-alpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340:291–5.
28. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004;114:232–9.
29. Du J, Guan T, Zhang H, Xia Y, Liu F, Zhang Y. Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368:402–7.
30. Lu DY, Tang CH, Chen YH, Wei IH. Berberine suppresses neuroinflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in BV-2 microglia. *J Cell Biochem*. 2010;110:697–705.
31. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*. 2007;100:328–41.
32. Sanderson LM, Boekschoten MV, Desvergne B, Muller M, Kersten S. Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPAR-alpha and PPAR-beta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiol Genomics*. 2010;41:42–52.
33. Zenimaru Y, Takahashi S, Takahashi M, Yamada K, Iwasaki T, Hattori H, et al. Glucose deprivation accelerates VLDL receptor-mediated TG-rich lipoprotein uptake by AMPK activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368:716–22.
34. Gafvels ME, Paavola LG, Boyd CO, Nolan PM, Wittmaack F, Chawla A, et al. Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology*. 1994;135:387–94.
35. Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:9252–6.
36. Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes*. 2008;57:332–9.
37. Rodriguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sanchez RM, Merlos M, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes*. 2008;57:2149–57.
38. Zheng Y, Zhang W, Pendleton E, Leng S, Wu J, Chen R, et al. Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese zucker rats. *J Endocrinol*. 2009;203:337–47.
39. Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:166–73.